Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

Research Article
Vol. 20, No. 1, Mar.-Apr. 2024, p. 119-134

Assessment of Cadmium, Lead and Nickel Removal Capacity of Lactic Acid Bacteria from Aqueous Solutions and Fresh Edible Vegetables

M. Mostafidi [1], M.R. Sanjabi [2*], N. Mojgani [3], S. Eskandari [4], S. Arbabi Bidgoli [5]

1- Ph.D. Candidate, Department of Food Science and Technology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran
(*- Corresponding Author Email: msanjabii@gmail.com)
3- Research & Development Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute-Agriculture Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4- Associate Professor, Food and Drug Laboratory Research Center (FDLRC), Food & Drug Administration (IR-FDA), Ministry of Health and Medical Education (MOH+ME), Tehran and Department of Food Sciences, School of Nutritional Sciences and Dietetics, Tehran University of Medical Sciences (TUMS), Tehran, Iran
5- Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences (IAUTMU), Tehran, Iran

Received: 11.12.2022 Revised: 29.03.2023 Accepted: 20.05.2023 Available Online: 20.05.2023	**How to cite this article:** Mostafidi, M., Sanjabi, M.R., Mojgani, N., Eskandari, S., & Arbabi Bidgoli, S. (2024). Assessment of cadmium, lead and nickel removal capacity of lactic acid bacteria from aqueous solutions and fresh edible vegetables. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *20*(1), 119-134. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.79869.1220

Introduction

The food and water contamination with heavy metals is increasing due to the environmental pollutions. Heavy metals are the elements with the density of more than 5 g/cm^3 and have become a serious problem as a result of the urbanization and industrialization. These toxic metals pollute water, soil, plants, and eventually foodstuffs and our bodies. Several methods exist to remediate heavy metal pollution in waters such as membrane filtration, ion exchange mechanisms, or by precipitation. Yet, these techniques are not cost effective, in some cases, and do produce wastes that need to be properly disposed of. Microbial bioremediation could be an alternative. The use of microbes for remediation of heavy metals has been well studied. Some microorganisms, especially soil bacteria, have the ability to tolerate these contaminants. In addition, certain bacterial strains are capable of binding to heavy metals or transforming them into less toxic forms. Low operating costs, usable in foodstuffs, selective removal for specific toxic metals, minimal use of chemicals (resulting in low sludge production) and high efficiencies at very low levels of heavy metals are some of the advantages of biosorption methods. In this regard, the purpose of this study was to investigate the ability of active and passive absorption of heavy metals by a number of Lactic Acid Bacteria (LAB) strains in laboratory environment and food.

Materials and Methods

Seven LAB isolates including *Lacticaseibacillus casei* (RTCC 1296-3), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (RTCC 1293-2), *Lactiplantibacillus plantarum* (RTCC 1290), *Limosilactobacillus fermentum* (RTCC 1303), *Enterococcus faecium* (RTCC 2347), *Lactobacillus helveticus* (RTCC 1304) and *Lactobacillus acidophilus* (RTCC 1299) were obtained from Razi type culture collection (RTCC), located at Razi vaccine and Serum Research Institute, Iran. All isolates were cultured in MRS (Scharlau, Spain) broth medium, at 37 °C for 24 hours, under anaerobic conditions. Pure cultures were preserved for long term by freezing at -70°C with 20% Glycerol. Heavy metals including Nitrate of Pb (II), Cd (II) and Ni (II) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All standard solutions were prepared from the stock solutions containing 1000 mgl^{-1} in distilled water. Other chemicals used in study including Nitric acid (65%) and Hydrogen peroxide (37%),

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.79869.1220

were also purchased from Merck, Germany. This study was conducted in two in- vitro and in-vivo phases; in the in- vitro phase, seven strains of bacteria with probiotic properties (*L. casei, L. rhamnosus, L. plantarum, L. fermentum, Ent. facium, L. helveticus* and *L. acidofilous*) were screened and then their ability to bind to cadmium (Cd), Lead (Pb) and nickel (Ni) in aqueous solution was investigated. Then, in the in-vivo stage, three probiotic strains that had the highest biosorption efficiency in the previously stage were selected and their effect with a ratio of 1:1:1 and contact time of 15 and 30 minutes on the removal of these toxic metals in coriander, leek and parsley fresh vegetables was evaluated. The residual concentrations of heavy metals in solution were measured by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS; ELAN DRC-e, PerkinElmer SCIEX, Canada) and Morphology of bacteria cell surfaces incubated with metals were monitored by scanning electron microscopy (JEOL JSM 5400 LV, Japan).

Results and Discussion

The results of the in vitro stage showed that the most ability to heavy metals adsorption was related to the *Ent. Facium* bacterium which were equal to 79.75±0.11, 75.28±0.05 and 83.99±0.10% for Pb, Cd and Ni, respectively. In general, the removal efficiency of heavy metals by LAB bacteria in the inactive and killed state was significantly higher than the active removal efficiency of these bacteria, so that the highest percentage of passive absorption of lead, cadmium and nickel metals by inactive strains of *L. casei, L. plantarum and Ent. Facium* were 90.01, 81.98 and 86.56%, respectively. Electron microscopy observations and energy dispersive X-ray (EDX) analysis confirmed that the majority of these toxic metals significantly damage the surface of living cells by accumulating and binding on the surface of bacterial cells. A combination of three bacterial strains had a synergistic effect on the binding properties of toxic metals compared to the single state of these bacteria, so that in both active and inactive states, 90-99% of heavy metals from edible leafy vegetables were removed in less than 15 minutes. The results of this research generally showed that the binding capacity of dead biomass is significantly high and it is possible to dispose and reuse biomass in case of biological absorption.

Keywords: Biosorption, Edible vegetables, Heavy metals, LAB bacteria, SEM/EDX

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
https://ifstrj.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۲۰، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۳ ص. ۱۳۴-۱۱۹

ارزیابی کاربرد باکتری‌های اسید لاکتیک در حذف فلزات سنگین از محلول‌های آبی و سبزیجات برگدار خوراکی

مهدیه مستفیدی [1]- محمدرضا سنجابی [2]*- ناهید مژگانی [3]- سهیل اسکندری [4]- سپیده اربابی بیدگلی [5]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۳۰

چکیده

آلودگی محیط‌زیست به فلزات سنگین، امروزه به یکی از مشکلات بزرگ زیست‌محیطی تبدیل شده است. در همین راستا، هدف از انجام این مطالعه بررسی توانایی جذب فعال و غیر فعال فلزات سنگین توسط تعدادی از سویه‌های LAB در محیط آزمایشگاهی (محلول آبی) و ماده غذایی (سبزیجات برگدار خوراکی) بود. نتایج مرحله آزمایشگاهی نشان داد که بطور کلی راندمان حذف فلزات سنگین توسط باکتری‌های LAB در حالت غیر فعال و کشته‌شده بطور قابل توجهی بالاتر از حالت فعال این باکتری‌ها بود بطوری‌که بیشترین درصد جذب غیرفعال فلز سرب، کادمیوم و نیکل به‌ترتیب برابر ۹۰/۰۱، ۸۱/۹۸ و ۸۶/۵۶ ٪ بود که به‌ترتیب توسط سویه‌های غیرفعال *L. casei*، *L. plantarum* و *Ent. Facium* صورت گرفت. در بین سویه‌های زنده نیز باکتری *Ent. Facium* بالاترین توانایی جذب فعال در محلول آبی را نشان داد. مشاهدات میکروسکوپ الکترونی تأیید کرد که بخش عمده این فلزات سمی با تجمع و اتصال در سطح سلول باکتری به‌طور قابل توجهی به سطح سلول‌های زنده آسیب می‌رساند ولی تأثیر چندانی بر ساختار سطح سلولی باکتری‌های کشته شده ندارد. ترکیبی از سه سویه باکتریایی در مقایسه با حالت تکی این باکتری‌ها اثر هم‌افزایی بر روی خواص اتصال فلزات سمی داشت بطوری‌که هم در حالت فعال و هم غیر فعال در مدت زمان کمتر از ۱۵ دقیقه ۹۹-۹۰ درصد فلزات سنگین از سبزیجات برگدار خوراکی حذف شدند. نتایج این تحقیق بطور کلی نشان داد ظرفیت اتصال توده مرده بطور قابل توجهی بالا بوده و امکان دفع و استفاده مجدد از زیست‌توده در صورت جذب زیستی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های LAB، جذب بیولوژیکی، سبزیجات خوراکی، فلزات سنگین، SEM/EDX

مقدمه

افزایش جمعیت همراه با توسعه اقتصادی و صنعتی جهان در قرن اخیر مشکلاتی را برای زندگی بشر به وجود آورده است که از جمله آنها می‌توان به آلودگی محیط‌زیست به فلزات سنگین اشاره کرد. فلزات سنگین ترکیبات غیرقابل تجزیه در هر دو شکل آلی و معدنی بوده (Fakhri *et al.*, 2020) که حداقل ۵ برابر چگالی تر از آب ($g/cm^3<5$) هستند، بنابراین پایدار هستند، در زنجیره غذایی متابولیزه نمی‌شوند و توانایی تجمع در بدن موجودات را دارند، در نتیجه در زنجیره غذایی بالا می‌آیند تا به بدن انسان برسند (Jaishankar, 2014).

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: msanjabii@gmail.com)
۳- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۴- دانشیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، اداره کل آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران و دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و رژیم‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تهران، ایران
۵- استاد گروه سم‌شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.79869.1220

نیکل (Ni)، کادمیوم (Cd)، سرب (Pb)، جیوه (Hg)، مس (Cu)، آرسنیک (As)، روی (Zn) و منگنز (Mn) رایج‌ترین فلزات سنگین و عوامل اصلی آلودگی خاک هستند (Shamim, 2018). اگرچه فلزات سنگین مانند روی، منگنز و مس به‌عنوان کوفاکتورهای ضروری در واکنش‌های آنزیمی برای رشد طبیعی سلول‌ها در غلظت‌های پایین عمل می‌کنند، اما هیچ نقش بیولوژیکی برای فلزاتی مانند Pb، As و Cd شناخته نشده است، به‌طوری‌که در هر غلظتی سمی هستند (Zahedifar *et al*., 2019). این عناصر آلاینده های معدنی غیر قابل تجزیه هستند و تمایل به تجمع در موجودات دارند. بنابراین قرار گرفتن در معرض فلزات سمی حتی در مقادیر کم ممکن است باعث بیماری های مختلفی از جمله آسیب به قلب، سیستم عصبی، مغز، کبد، کلیه، خون، ریه، استخوان، طحال، پوکی استخوان، اختلال در تولید مثل، جهش‌زایی و سرطان شود. مصرف سبزیجات و مواد غذایی آلوده به فلزات سنگین ممکن است باعث کاهش توانایی سیستم ایمنی، اختلال در رفتار فیزیکی- اجتماعی، عقب ماندگی رشد داخل رحمی و ناتوانایی های مرتبط با سوء تغذیه شود (Majlesi *et al*., 2017).

منابع اصلی آلودگی فلزات سنگین در محیط‌زیست ناشی از سوزاندن سوخت‌های فسیلی، بهره‌برداری از کارخانه‌های ذوب فلزات و سایر فعالیت‌های صنعتی مانند آبکاری و ضایعات تقطیر، استخراج و فرآوری مواد معدنی و تولید و استفاده از مواد شیمیایی به‌عنوان کودهای شیمیایی کشاورزی است (Sardar *et al*., 2013). روش‌های فیزیکوشیمیایی مورد استفاده برای سم‌زدایی فلزات سنگین مانند رسوب شیمیایی، الکترووینینگ[1]، جداسازی غشایی، تبخیر یا تبادل یونی رزین، می‌توانند بسیار گران‌قیمت باشند و گاهی اوقات چندان مؤثر نباشند. جداسازی بیولوژیکی، براساس میکروارگانیسم‌ها یا گیاهان زنده یا غیر زنده، کاهش سطوح فلزات سمی را تا حد قابل قبول زیست‌محیطی به روشی مقرون‌به‌صرفه و سازگار با محیط‌زیست ارائه می‌دهد (Kadukova *et al*., 2005).

جذب زیستی[2] و تجمع زیستی[3] از جمله روش‌های بیولوژیکی مناسب برای حذف فلزات سنگین از فاضلاب‌ها و مواد غذایی است. جذب زیستی در واقع تثبیت غیر فعال فلزات توسط زیس توده است. مکانیسم‌های جذب سطح سلولی مستقل از متابولیسم سلولی هستند. آنها براساس برهمکنش‌های فیزیکوشیمیایی بین فلزات و گروه‌های عملکردی دیواره سلولی استوارند. دیواره سلولی میکروارگانیسم عمدتاً از پلی ساکاریدها، لیپیدها و پروتئین‌ها تشکیل شده است که امکان اتصال زیادی برای فلزات دارند. از آنجایی که این فرآیند مستقل از متابولیسم است، اتصال فلزات بسیار سریع بوده (تا یک دقیقه) و عمدتاً برگشت پذیر است (Kadukova *et al*., 2005; Delgado *et al*., 1998). تجمع زیستی یک تجمع فلزی درون سلولی است. این فرآیند شامل اتصال فلز به ترکیبات درون سلولی، رسوب درون سلولی، متیلاسیون و مکانیسم‌های دیگر است. تجمع زیستی همچنین می‌تواند به‌عنوان بخش دوم فرآیند جداسازی فلز توسط زیست‌توده زنده در نظر گرفته شود. گاهی اوقات، آن را جذب زیستی فعال در مقابل جذب بیولوژیکی غیرفعال می‌نامند. از آنجایی‌که این فرایند بستگی به متابولیسم سلولی دارد، می‌تواند توسط مهارکننده‌های متابولیک مانند دمای پایین و کمبود منابع انرژی (نور) مهار شود (Shamim, 2018; Kadukova *et al*., 2005). یکی از تفاوت‌های اساسی بین این دو فرآیند، سینتیک و مقادیر انرژی فعال‌سازی آنها است. انرژی فعال‌سازی مورد نیاز برای جذب زیستی حدود ۲۱ کیلوژول بر مول است که با ماهیت فیزیکی فرآیند مطابقت دارد در حالی‌که انرژی فعال‌سازی برای تجمع زیستی حدود ۶۳ کیلوژول بر مول است که مربوط به فرآیند بیوشیمیایی می‌باشد (Kadukova *et al*., 2005).

بطور کلی هزینه‌های عملیاتی پایین، قابلیت استفاده در مواد غذایی، حذف انتخابی برای فلزات سمی خاص، حداقل استفاده از مواد شیمیایی (در نتیجه تولید لجن کم)، عدم نیاز به مواد مغذی و راندمان بالا در سطوح بسیار پایین فلزات سنگین از مزایای روش‌های بیولوژیکی است (Mirza Alizadeh *et al*., 2021; Sardar *et al*., 2013). علاوه بر این، فرآیند حذف سریع است بطوری‌که تنها چند دقیقه طول می‌کشد و در شرایط فشار معمولی و دمای معمولی انجام می‌شود (Kadukova *et al*., 2005). با این حال، تعداد محدودی از تصفیه‌خانه‌ها با استفاده از فرآیندهای مبتنی بر جذب زیستی/تجمع زیستی وجود دارد.

باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) باکتری‌های گرم مثبتی هستند که به‌طور کلی به‌عنوان ایمن (GRAS) توسط FDA شناخته شده‌اند و سابقه قوی در کاربرد ایمن به‌عنوان مکمل‌های پروبیوتیک دارند (Mrvčić *et al*., 2012). باکتری‌های پروبیوتیک به‌دلیل تمایل پیوندی زیاد با پروتئین‌های دیواره سلولی روده به‌طور بالقوه در غیرفعال کردن سموم، مفید هستند (Zoghi *et al*., 2014). محققان بر این باورند که باکتری‌های LAB می‌توانند از جذب فلزات سنگین در بدن جلوگیری کنند و مصرف خوراکی LAB می‌تواند فلزات سنگین را به طور مؤثر از طریق مدفوع از بدن خارج کند (Kinoshita *et al*., 2013). این باکتری‌ها عموماً در برابر آسیب ناشی از فلزات سنگین از طریق جداسازی یا تجمع مقاوم هستند (Zhai *et al*., 2015). استفاده از LAB ها به‌عنوان یک جاذب بیولوژیکی به‌دلیل گزینش‌پذیری بالای آنها در حذف فلزات سمی، هزینه کم، در دسترس بودن بالا و توانایی

1- Electro-winning
2- Biosorption/ bioadsorption
3- Bioaccumulation

آنها در حفظ عملکرد در طیف وسیعی از دما و pH مورد تأیید قرار گرفته است (Pakdel *et al*., 2019). اخیراً، چندین گونه از باکتری‌های LAB توجه زیادی را به استفاده بالقوه آنها در حذف فلزات سنگین برای محافظت از سلامت انسان جلب کرده است (Elsanhoty *et al.*, 2016; Kinoshita *et al*., 2013; Daisley *et al*., 2019; Massoud *et al*., 2020; Kirillova *et al*., 2017; Halttunen *et al*., 2007).

با این حال، تحقیقات بیشتری در مورد قابلیت اتصال فلزات سنگین به باکتری‌های LAB به‌عنوان یک پروبیوتیک برای سلامت انسان مورد نیاز است. بنابراین، در این مطالعه اثر هفت سویه منتخب اسید لاکتیک (LAB) شامل *L. casei*، *L. rhamnosus*، *L. plantarum*، *L. fermentum*، *Ent. Facium*، *L. helveticus* و *L. acidofilous* در دو حالت فعال (تجمع زیستی) و غیر فعال (جذب زیستی) بر جذب بیولوژیکی عناصر فلزی سنگین شامل سرب (Pb)، کادمیوم (Cd) و نیکل (Ni) از محلول آبی (*in- vitro*) و سبزیجات تازه خوراکی (*in-situ*) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه های باکتریایی و شرایط کشت

سویه باکتری‌های LAB شامل Lacticaseibacillus casei (RTCC 1296-3)، Lacticaseibacillus rhamnosus (RTCC 1293-2)، Lactiplantibacillus plantarum (RTCC 1290)، Limosilactobacillus fermentum (RTCC 1303)، Enterococcus faecium (RTCC 2347)، Lactobacillus helveticus (RTCC 1304) و Lactobacillus acidophilus (RTCC 1299) از مجموعه کلکسیون میکروبی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد. تمامی سویه‌ها در محیط کشت مایع MRS[1] (Scharlau, Spain) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی کشت داده شدند. جهت نگهداری طولانی مدت، کشت‌های خالص با ۲۰ درصد گلیسرول با انجماد در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

فلزات سنگین شامل نیترات سرب (II)، کادمیوم (II) و نیکل (II) از شرکت مرک (دارمشتات، آلمان) خریداری شد. تمام محلول‌های استاندارد از محلول‌های استوک حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در آب مقطر تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه شامل اسید نیتریک (۶۵٪) و پراکسید هیدروژن (۳۷٪) نیز از شرکت مرک آلمان خریداری شد. تمامی ظروف مورد استفاده به مدت ۴۸ ساعت با اسید نیتریک ۲۰ درصد شستشو داده شدند.

جذب بیولوژیکی در محلول آبی (In-vitro)

سوسپانسیون کشت یک شبه فعال و غیر فعال سویه‌های LAB در غلظت 10^9 CFU/ml سانتریفیوژ شد (با سرعت ۱۰۰۰۰ ×g به مدت ۱۰ دقیقه)، و پلت[2] سلولی پس از جمع‌آوری با ۵ cc آب خالص استریل سرد شده مخلوط و به مدت پنج دقیقه قبل از استفاده هم زده شدند. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون پلت آماده شده به ۹ میلی‌لیتر محلول استاندارد از هر فلز سنگین (۵ ppm محلول سرب، ۵ ppm محلول کادمیوم و ۵۰ ppm محلول نیکل) اضافه شد تا غلظت باکتریایی نهایی 10^8 CFU/ml بدست آید. برای تنظیم pH روی ۶/۵ از محلول هیدروکسید سدیم ۰/۵ نرمال استفاده شد. پس از گرمخانه‌گذاری به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محلول‌ها در ×g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی برای اندازه گیری مقدار فلزات سنگین استفاده شد (Kadukova *et al*., 2005). لازم به ذکر است که به‌منظور تهیه کشت غیر فعال باکتری‌های اسید لاکتیک مورد نظر، پس از رشد باکتری‌ها در محیط کشت MRS براث و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، باکتری‌ها در غلظت 10^9 CFU/ml تنظیم و سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. پس از اطمینان از کشته شدن باکتری‌ها از این سوسپانسیون به‌عنوان سوسپانسیون غیر فعال در ازمایشات استفاده شد.

جذب بیولوژیکی در سبزیجات خوراکی (In-vivo)

سه نوع سبزی شامل گشنیز، تره فرنگی و جعفری از بازار محلی تهران خریداری و قسمت‌های خوراکی برگ‌دار سبزیجات جدا شده و به‌صورت جداگانه به سه قسمت مساوی ۱۰۰ گرمی تقسیم شدند و قبل از استفاده در کیسه‌های پلاستیکی زیپ دار در دمای یخچال نگهداری شدند. قبل از شروع روش جذب بیولوژیکی، مقدار فلزات مربوطه در سبزیجات انتخابی مورد ارزیابی قرار گرفت تا غلظت فلزات قبل و بعد از قرار گرفتن در معرض باکتری‌های اسید لاکتیک مورد مقایسه قرار گیرد. در این مرحله سه سویه از باکتری‌های اسید لاکتیک شامل *L. plantarum*، *L. fermentum* و *E. faecium* که بالاترین درصد جذب فلزات سنگین را در محلول‌های آبی نشان دادند، انتخاب شدند. کشت فعال و غیر فعال سویه‌های مربوطه به نسبت مساوی (۱:۱:۱) مخلوط شده و به نمونه‌های سبزیجات اضافه شدند. نمونه‌های گشنیز، تره فرنگی و جعفری قبل از افزودن 10^8 CFU/ml از سوسپانسیون های باکتریایی مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در آب مقطر استریل خیسانده شدند (Zhai *et al*., 2016). نمونه‌ها پس از ۱۵ و ۳۰ دقیقه خیساندن

1- Deman- Rogosa- Sharp (MRS)

2- pellets

و تماس با محلول باکتریایی از نظر میزان فلزات سنگین مربوطه توسط روش ICP-MS مورد آزمایش قرار گرفتند.

سنجش میزان جذب فلزات سنگین با طیف‌سنج جرمی پلاسما جفت القایی[۱] (ICP-MS)

یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی (10^9 CFU/ml) به ۹ میلی‌لیتر آب فوق خالص حاوی ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم، یک میلی گرم در لیتر سرب و سه میلی‌گرم در لیتر نیکل اضافه شد تا به غلظت باکتری نهایی برسد (10^8 CFU/ml). پس از تنظیم pH بر روی ۶/۵ نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و سپس در دور ۱۰۰۰۰ ×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. غلظت باقیمانده سرب، کادمیوم و نیکل در مایع رویی توسط طیف‌سنج جرمی پلاسمای جفت القایی (ICP-MS؛ ELAN DRC-e، PerkinElmer SCIEX، کانادا)، با استفاده از پنج غلظت استاندارد (۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر) اندازه‌گیری شد. برای هر فلز سنگین، آزمایش در سه تکرار انجام شد و توانایی اتصال سرب، کادمیوم و نیکل هر یک از سویه‌های مورد مطالعه به صورت درصد حذف با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد که در آن C_0 و C_1 به‌ترتیب غلظت اولیه و باقیمانده فلز هستند (Daisley *et al.*, 2019; Pakdel *et al.*, 2019; Astolfi *et al.*, 2019).

$$\text{Removal \%} = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100$$

آزمون میکروسکوپی الکترونی روبشی (SEM [۲]) و طیف‌سنجی پراکندگی انرژی پرتو ایکس (EDX[۳])

به‌منظور بررسی اثر جذب فلزات سنگین بر ساختار سلولی و مورفولوژی سویه‌های LAB آزمایش‌شده، پلت‌های سلولی باکتریایی تیمار شده با فلز و تیمار نشده (شاهد) طبق روش توصیف‌شده توسط آمین و همکاران (Ameen *et al.*, 2020) و دیزلی و همکاران (Daisley *et al.*, 2019) مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌های تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (JEOL JSM 5400 LV, Japan) اسکن شدند. علاوه بر این، تشخیص عناصر فلزی در سلول‌های LAB با استفاده از طیف‌سنج پراکندگی انرژی پرتو ایکس (EDX) (JEOL JSM 6360 LA, Japan) انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد و نتایج حاصل میانگین حداقل سه تکرار بود. داده‌های به‌دست آمده با روش آنالیز واریانس (ANOVA) و استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 22.0 (SPSS Inc, IBM, Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌ها نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح احتمال $p<0.05$ تعیین شد.

نتایج و بحث

حذف فلزات سنگین از محلول‌های آبی توسط برخی سویه های LAB بصورت زنده و غیر زنده

میزان حذف بیولوژیکی فلزات سنگین شامل نیکل (Ni)، کادمیوم (Cd) و سرب (Pb) در محلول‌های آبی توسط ۷ سویه باکتری‌های اسید لاکتیک بصورت فعال (زنده) و غیر فعال (غیر زنده) به‌ترتیب در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که بین سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک فعال از نظر درصد جذب فلزات سنگین از محلول‌های آبی تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p>0.05$). همانطور که مشاهده می شود میزان جذب زیستی فعال (تجمع زیستی) فلز سرب در محدوده ۷۹/۷۵ تا ۴۷/۶۵ درصد بوده و بیشترین مقدار آن توسط *E. faecium* صورت گرفت و *L. fermentum* با میزان جذب ۷۶/۵۹ درصد در رتبه دوم قرار گرفت ($p<0.05$). کمترین میزان جذب زیستی فعال سرب از محلول آبی توسط *L.casei* انجام شد که معادل ۴۷/۶۵ درصد بود (جدول ۱). روند مشابهی در مورد جذب فلزات کادمیوم و نیکل از محلول آبی مشاهده شد، به این معنی که بیشترین میزان جذب زیستی فعال در این دو عنصر نیز توسط *E. faecium* صورت گرفت که برای کادمیوم و نیکل به‌ترتیب برابر با ۷۵/۲۸ و ۸۳/۹۹ درصد بود. با توجه به نتایج این مطالعه، باکتری *L. fermentum* و *L. plantarum* پس از *E. faecium* بالاترین ظرفیت جذب زیستی عناصر سنگین را داشت (جدول ۱). کمترین میزان جذب بیولوژیکی کادمیوم (۲۴/۸۷ درصد) و نیکل (۶۷/۷۲ درصد) مشابه با فرآیند حذف سرب متعلق به *L. casei* بود. لازم به ذکر است که به‌طور کلی درصد حذف نیکل (۶۷/۷۲–۸۳/۹۹) توسط سویه‌های باکتری های اسید لاکتیک فعال به‌طور معنی‌داری بیشتر از سرب و کادمیوم بود ($p<0.05$).

راندمان حذف این سه فلز سنگین از محلول آبی توسط ۷ سویه باکتری اسید لاکتیک مورد نظر در این مطالعه، پس از کشته شدن و غیر فعال کردن باکتری‌ها در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه نیز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است.

1- Inductively coupled plasma-mass spectrometer
2- Scanning Electron Microscopic
3- Energy Dispersive X-ray

جدول ۱- راندمان حذف فلزات سنگین توسط سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک زنده در محلول آبی

Table 1- Heavy metals removal efficiency of indigenous LAB isolates in aqueous solution

سویه های پروبیوتیک زنده Live Probiotic strains	میزان حذف فلزات سنگین Heavy metal removal (%)		
	Pb	Cd	Ni
L. casei	47.65±0.20^{g,B}	24.87±0.17^{f,C}	67.72±0.12^{g,A}
L. rhamnosus	62.35±0.15^{d,B}	49.74±0.21^{d,C}	78.42±0.18^{e,A}
L. plantarum	66.60±0.12^{c,B}	53.06±0.10^{b,C}	81.82±0.22^{b,A}
L. fermentum	76.59±0.08^{b,B}	52.60±0.07^{c,C}	81.53±0.15^{c,A}
E. faecium	79.75±0.11^{a,B}	75.28±0.05^{a,C}	83.99±0.10^{a,A}
L. helveticus	50.70±0.12^{f,B}	22.27±0.09^{g,C}	78.99±0.08^{d,A}
L. acidophilus	55.62±0.18^{e,B}	48.34±0.14^{e,C}	76.21±0.21^{f,A}

* حروف کوچک غیر مشترک در هر ستون و حروف بزرگ غیر مشترک در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۹۵ درصد می‌باشد (p<۰/۰۵).

* Different small letters in each column and uppercase letters in each row indicate statistically significant differences between groups as determined by the Duncan test (p<0.05).

همانطور که مشاهده می‌شود بطور کلی راندمان حذف فلزات سنگین توسط باکتری‌های LAB در حالت غیر فعال و کشته شده بطور قابل توجهی بالاتر از راندمان حذف فعال این باکتری‌ها می‌باشد که با مقایسه موردی هر کدام از عناصر سرب، نیکل و کادمیوم، این نتیجه به وضوح قابل مشاهده می‌باشد. طبق نتایج بدست آمده، بالاترین درصد جذب غیرفعال (جذب زیستی) فلز سرب به *Ent. Facium* (۹۸/۲۸ درصد) تعلق داشت و پس از آن باکتری *L. fermentum* با میزان جذب ۹۷/۸۵ درصد بود که به‌ترتیب حدود ۱۸/۵۳ و ۲۱/۲۶ درصد افزایش حذف فلز سرب توسط این سویه‌ها در مقایسه با جذب فعال حاصل گردید. همچنین مشخص شد که این دو باکتری اسید لاکتیک در هر دو حالت جذب فعال و غیر فعال بالاترین درصد جذب سرب را داشتند ولی در مورد میزان جذب غیر فعال سرب توسط سایر گونه‌ها بعد از کشته‌سازی باکتری‌ها روند تغییر پیدا کرد بدین معنی که در حالت غیر فعال کمترین میزان جذب در باکتری *L. acidofilous* مشاهده گردید که برابر ۸۳/۴۸ درصد بود که این مقدار حتی از بالاترین میزان جذب سرب صورت گرفته در حالت فعال بیشتر است (جدول ۱). در مورد فلز سنگین کادمیوم بالاترین درصد جذب غیرفعال به باکتری *L. plantarum* (۸۱/۹۸ درصد) تعلق داشت که نسبت به جذب فعال این فلز توسط همین سویه حدود ۳۱ درصد افزایش نشان داد و *Ent. Facium* و *L. fermentum* در جایگاه بعدی بودند. در مورد فلز نیکل نیز میزان جذب غیر فعال مشابه حالت فعال در باکتری *Ent. Facium* مشاهده شد که برابر ۸۶/۵۶ درصد بود و نشان دهنده ۲/۶ درصد افزایش نسبت به جذب فعال بود و پس از آن *L. plantarum* و *L. fermentum* قرار داشتند. لازم به ذکر است که کمترین میزان جذب غیر فعال در کادمیوم و نیکل به باکتری *L. casei* تعلق داشت که به‌ترتیب ۵۵/۳۱ و ۷۸/۶۵ درصد محاسبه گردید و حاکی از افزایش ۳۰/۵ و ۱۱/۹ درصد افزایش جذب این فلزات نسبت به حالت فعال در مدت یک ساعت بود (جدول ۲).

جدول ۲- راندمان حذف فلزات سنگین توسط سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک غیر زنده (کشته شده) در محلول آبی

Table 2- Heavy metal removal efficiency by inactivated (killed) LAB strains in aqueous solution

سویه‌های پروبیوتیک غیرزنده Inactivated probiotic strains	میزان حذف فلزات سنگین Heavy metal removal (%)		
	Pb	Cd	Ni
L. casei	90.01±0.26^{d,A}	55.31±0.15^{f,C}	78.65±0.33^{e,B}
L. rhamnosus	87.29±0.15^{e,A}	75.57±0.25^{d,C}	79.34±0.22^{d,B}
L. plantarum	91.01±0.21^{c,A}	81.98±0.18^{a,C}	83.98±0.18^{b,B}
L. fermentum	97.85±0.15^{b,A}	79.87±0.33^{b,C}	83.89±0.25^{b,B}
E. faecium	98.28±0.11^{a,A}	79.95±0.28^{b,C}	86.56±0.11^{a,B}
L. helveticus	85.35±0.18^{f,A}	61.37±0.21^{e,C}	80.08±0.19^{c,B}
L. acidophilus	83.48±0.08^{g,A}	77.22±0.14^{c,C}	79.12±0.21^{d,B}

* حروف کوچک غیر مشترک در هر ستون و حروف بزرگ غیر مشترک در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۹۵ درصد می‌باشد (p<۰/۰۵).

* Different small letters in each column and uppercase letters in each row indicate statistically significant differences between groups as determined by the Duncan test (p<0.05).

حذف بیولوژیکی فلزات سنگین یک فرآیند سطحی به دلیل اتصال کاتیون‌های فلزی به گروه‌های عامل آنیونی است و همچنین به ظرفیت سویه‌های باکتری و الکترونگاتیوی فلز بستگی دارد (Afraz *et al.*, 2021). باکتری‌های LAB دارای پلیمرهایی مانند پپتیدوگلیکان و

لیپوتیکوئیک اسید[1] در دیواره سلولی خود است که می‌تواند مسئول برهمکنش بین فلزات سنگین و بار منفی سطح باکتری باشد (Massoud *et al*., 2020). از آنجایی‌که این فرآیند مستقل از متابولیسم است، می‌تواند توسط سلول‌های زنده و همچنین سلول‌های مرده انجام شود. این بر خلاف تجمع زیستی است که در آن فقط سلول های زنده فلزات سنگین را به‌طور فعال جذب می‌کنند. به‌طور کلی باکتری‌های گرم مثبت به دلیل ساختار دیواره سلولی ساده‌تر، کنترل کمتری نسبت به ورود مواد خارجی نشان می‌دهند، در صورتی‌که باکتری‌های گرم منفی دیواره سلولی و ساختار پروتئینی پیچیده تری داشته و ورود و جذب آلاینده‌های معدنی موجود در محیط بیرونی این باکتری‌ها، از جمله فلزات سنگین، با کنترل بیشتر و به میزان کمتری صورت می‌گیرد (Jaishankar *et al*., 2014).

نتایج این تحقیق با یافته‌های کادوکووا و همکارانش (Kadukova *et al*., 2005) مطابقت داشت. آن‌ها با مقایسه روش جذب فعال و غیر فعال مس با استفاده از جلبک *Chlorella kessleri* بیان داشتند که غلظت مس در ۳۰ دقیقه اول پس از افزودن سلول‌های زنده *C. kessleri* کاهش یافت. در اندازه‌گیری‌ها در تمام آزمایش‌هایی که از سلول‌های زنده استفاده شده بود، آزادسازی جزئی مس را به محلول نشان داد. رهاسازی مس از سطح سلول‌های زنده زمانی واضح‌تر بود که نمونه‌ها هر ۵ دقیقه در ۳۰ دقیقه اول و هر ۱۵ دقیقه در طول ۳۰ دقیقه بعدی آزمایش جمع‌آوری شدند. احتمالاً به دلیل مسمومیت، سلول‌های جلبکی تا حدی ظرفیت اتصال خود را از دست داده‌اند و متعاقباً مقدار کمی فلز دوباره به محلول آزاد می‌شود. اما پس از چند ساعت، مسمومیت شدید احتمالا باعث مرگ برخی از سلول‌ها شده و به همین دلیل نسبت بین سلول‌های زنده و مرده تغییر کرده است. از آنجایی که سلول‌های مرده ظرفیت جذب بالاتری از خود نشان داده‌اند، بخشی از مس آزاد شده در پایان آزمایش برگشت داده شد. در مقایسه با سلول‌های زنده پس از افزودن توده سلولی خشک شده، یون‌های مس به سرعت از محلول در عرض ۱۰ دقیقه جذب شد و اثر افزایش جزئی غلظت مس در محلول مشاهده نشد. این محققان در نهایت بیان داشتند که سرعت بالای فرآیند نشان می‌دهد که در هر دو مورد (تجمع زیستی و جذب زیستی)، مکانیسم‌های تجمع مس مستقل از متابولیسم هستند. با استناد به نتایج این تحقیق، می‌توان گفت که در تحقیق حاضر نیز مکانیسم جذب این فلزات بویژه نیکل مستقل از متابولیسم بوده چرا که در هر دو حالت جذب فعال و غیر فعال سرعت جذب بسیار بالا بوده و در مدت زمان یکساعت میزان جذب به حداکثر مقدار خود رسیده است. گویال و همکاران (Goyal *et al*., 2019) فرایند جذب فیزیکی و کمپلکس شدن بین فلز و گروه‌های آمینه و کربوکسیل پلی ساکاریدهای دیواره سلولی را مکانیسم‌های جذب فلزات سنگین از محلول‌های آبی توسط میکروارگانیسم‌ها معرفی کردند. تحقیق حاضر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH=۶/۵ انجام شد که براساس بررسی منابع علمی و سپس پیش‌تیمارهای انجام شده، بیشترین میزان جذب فلزات سنگین توسط سویه‌های LAB انتخاب شده در این مطالعه در این شرایط صورت گرفت. جذب زیستی یک فرآیند وابسته به انرژی است و از این رو دما نقش مهمی در کارآیی حذف فلزات توسط آن ایفا می‌کند. این تغییر درجه حرارت که بر دیواره سلولی و قسمت‌های عملکردی آن تأثیر می‌گذارد، با تغییر پایداری و ترکیب دیواره سلولی وضعیت یونیزاسیون گروه‌های عملکردی افزایش یا کاهش می‌یابد. افزایش دما باعث افزایش اندازه منافذ است که در نتیجه سطح بیشتری برای جذب زیستی در دسترس است. همچنین میزان انتشار را افزایش داده و ویسکوزیته محیط را کاهش داده و منجر به افزایش کارآیی حذف فلزات سنگین می‌شود (Goyal *et al*., 2019). آریوالاگان و همکاران (Arivalagan *et al*., 2014)، اثر *Bacillus. cereus* را بر جذب بیولوژیکی کادمیوم در دمای ۲۵، ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند حداکثر حذف کادمیوم در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد (۷۲ درصد) حاصل شد که در آن افزایش قابل توجهی در کارایی جذب بیولوژیکی نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (۴ درصد) ثبت شد، که دلیل آن را افزایش اندازه منافذ و در نتیجه افزایش سطح برای جذب زیستی در دسترس عنوان کردند (Rathinam *et al*., 2010). اما با افزایش دما از ۳۵ درجه سانتی‌گراد به ۴۵ درجه سانتی‌گراد، جذب زیستی کادمیوم کاهش یافت که این ممکن است به دلیل تخریب محل‌های اتصال کادمیوم در دیواره سلولی توسط پارگی پیوند که منجر به کاهش پتانسیل اتصال کادمیوم می‌شود اتفاق افتاده باشد (Sulaymon *et al*., 2013). در همین راستا هالتتونن و همکاران (Halttunen *et al*., 2008) افزایش قابل توجهی در حذف کادمیوم توسط لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG هنگامی‌که دمای انکوباسیون به ۳۷ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت، گزارش کردند.

pH عامل دیگری است که نقش مهمی در حذف بیولوژیکی فلزات سنگین دارد. تغییرات pH محیط بر بار سطحی دیواره سلولی با تأثیر بر گروه‌های عاملی با بار منفی و تفکیک آنها تأثیر می‌گذارد (Özdemir *et al*., 2013). این موضوع به خوبی در مطالعه انجام شده توسط آریوالاگان و همکاران (Arivalagan *et al*., 2014)، به اثبات رسیده است. *B. cereus* از خاک نزدیک صنعت آبکاری جدا شده و در حضور کادمیوم، در شرایط آزمایشگاهی رشد کرد. در pH=۲، ارگانیسم به دلیل یونیزاسیون کم گروه‌های عاملی جذب ناچیزی از خود نشان داد. همچنین، غلظت بالای H^+ در pH اسیدی برای مکان‌های اتصال

[1] 1- lipoteichoic acid

موجود رقابت می‌کند که باعث پروتونه شدن دیواره سلولی می‌شود (Rathinam *et al.*, 2010). این مطالعه همچنین گزارش می‌دهد که در pH نسبتا اسیدی ۴، بارهای منفی روی دیواره سلولی افزایش می‌یابد و غلظت پروتون کاهش می‌یابد که منجر به کاهش بیشتر کادمیوم می‌شود. علاوه بر این در pH برابر ۶ حداکثر کاهش کادمیوم در نتیجه پروتون‌زدایی کامل گروه‌های عاملی مانند گروه‌های کربوکسیل و آمینو گزارش شد (Xiao *et al.*, 2010). بالاتر از این pH، کاهش قابل توجهی در جذب مشاهده شد که این امر با افزایش گروه هیدروکسیل که با کادمیوم واکنش داده و آن را رسوب می‌دهد، توضیح داده شده است (Hossain *et al.*, 2013). الهیان و همکاران (Elahian *et al.*, 2013) نیز نشان دادند در pH<۳ رقابتی بین نیکل و پروتون در جهت اتصال به گروه‌های سطحی ایجاد شد در نتیجه میزان جذب پایین آمد از طرفی دیگر در pH>۷، نیکل به صورت هیدروکسید رسوب کرده و مقدار آن به صورت آزاد کاهش یافته و در نتیجه میزان جذب روند نزولی داشت.

غلظت یکی دیگر از عواملی است که می‌تواند بر روی جذب فلزات سنگین توسط میکروارگانیسم‌ها مؤثر باشد. در این راستا افراز و همکاران (Afraz *et al.*, 2021) با بررسی اثر *Lactobacillus paracasei* بر جذب بیولوژیکی سرب و کادمیوم در محلول آبی نشان دادند که بیشترین حذف این فلزات سنگین در pH بالا، اندازه تلقیح بالا و غلظت کم این عناصر برابر با ۸۵/۷۷ درصد بوده است. با توجه به نتایج آنها، علت کاهش جذب بیولوژیکی عناصر سنگین با افزایش غلظت اولیه، علاوه بر ناکافی بودن محل‌های اتصال به سبب اشباع محل‌های اتصال فلز، به‌دلیل سمی بودن این عناصر که منجر به کاهش رشد سلولی ارگانیسم می‌شود ذکر شده است. این نتایج همچنین در مطالعه ای توسط پرییالاکسمی و همکاران (Priyalaxmi *et al.*, 2014) که بر روی *B. safensis* جدا شده از رسوبات انجام شد، مورد تأیید قرار گرفت. آن‌ها گزارش دادند در غلظت ۴۰ppm میزان جذب بیولوژیکی کادمیوم ۸۳/۵ درصد بود در حالی‌که با افزایش غلظت کادمیوم به ۶۰ppm این کاهش به ۹۸ درصد افزایش یافت ولی در ادامه با افزایش غلظت کادمیوم میزان جذب آن روند نزولی نشان داد.

اثر فلزات سنگین بر ویژگی‌های مورفولوژی و ساختاری سطح سلول‌های باکتریایی

تأثیر یون‌های فلزات سنگین بر روی سطوح سلولی در حالت جذب فعال و جذب غیر فعال با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) ارزیابی شد. طبق نتایج مرحله درون تنی[1] باکتری *Ent. Faecium* دارای بیشترین ظرفیت جذب فعال هر سه فلز مورد بررسی در این مطالعه بود، ظرفیت جذب غیر فعال این باکتری نیز اگرچه در مورد سرب و کادمیوم در رتبه دوم قرار داشت ولی به دلیل امکان مقایسه بهتر و همچنین کیفیت بالاتر تصاویر SEM آن و امکان ارزیابی بهتر روند تغییرات سطح سلولی نسبت به دو فلز دیگر در نهایت اثر یون های فلز سرب بر مورفولوژی سطح سلولی زیست توده *Ent. Faecium* در حالت جذب فعال (شکل ۱) و جذب غیر فعال (شکل ۲) انتخاب گردید.

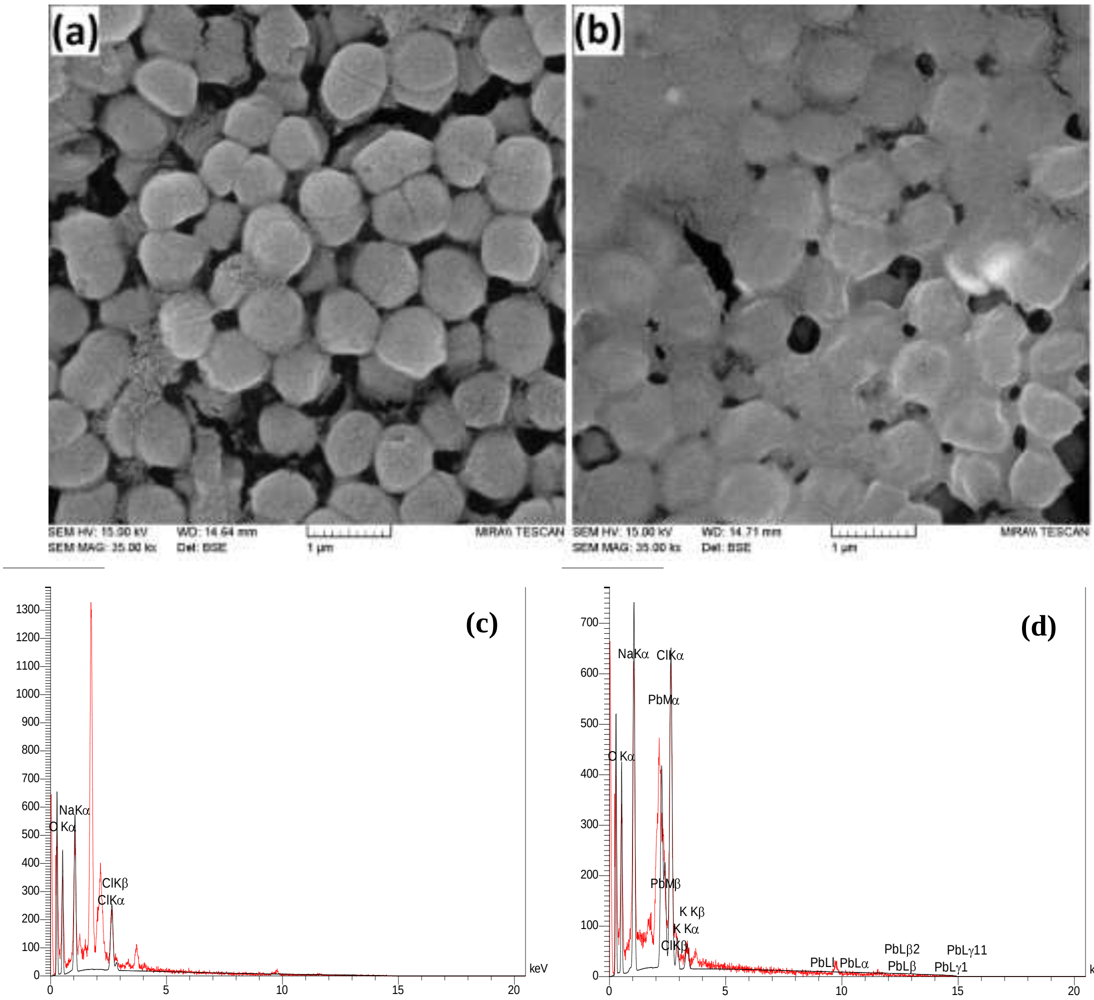
همانطور که در شکل (۱–b) مشاهده می شود رسوبات آشکار سرب روی سطح سلول‌ها قابل مشاهده بوده که نشان‌دهنده ظرفیت اتصال بالای سرب توسط توده سلولی باکتری می‌باشد، در حالی‌که هیچگونه رسوب سربی در میکروگراف‌های سلول‌های تیمار نشده (نمونه کنترل) قابل مشاهده نبود (شکل ۱–a). علاوه بر این، میکروگراف‌های SEM نشان داد که قرار گرفتن در معرض سرب منجر به تجمع عظیم سلول‌های *Ent. Faecium* در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، بدون تغییر مورفولوژیکی می‌شود. این پدیده ممکن است نوعی محافظت از خود توسط سلول‌های باکتری باشد که در اثر تغییر بار سطحی و انحطاط[2] پروتئین‌های سطحی که در اثر قرار گرفتن در معرض سرب افزایش یافته و منجر به تجمع سلول‌ها شده، ایجاد می‌شود (Zhai *et al.*, 2015). احتمالاً به دلیل آسیب ناشی از سمیت سرب، سلول‌ها تا حدی توانایی اتصال خود را از دست داده اند و در نتیجه غلظت سرب در محلول بعد از ۱ ساعت بیشتر از ۱۵–۱۰ دقیقه اولیه جذب فعال است. نتایج مشابهی کادوکووا و همکارانش(Kadukova *et al.*, 2005) گزارش شده است مبنی بر اینکه تصاویر SEM آسیب روی سطوح سلول‌های زنده را نشان داد که با اسکن EM به‌صورت حفره‌های دهانه ای قابل مشاهده بود. آسیب‌های مشابهی به شکل غارها در تصاویر بخش سلولی به دست آمده با تکنیک TEM توسط این محققان مشاهده شد. همچنین جداسازی دیواره سلولی که احتمالاً باعث تخریب بعدی سلولی می‌شود، نیز به صورت پراکنده در جذب فعال فلزات سنگین از جمله نیکل و کادمیوم توسط باکتری‌ها مشاهده شده است (Jain *et al.*, 2017; Goyal *et al.*, 2019). این در حالی بود که طبق تصاویر SEM ارائه شده در شکل ۲–a و ۲–b هنگامی که سلول‌های خشک و غیرفعال *Ent. Faecium* در فرآیند استفاده شد، آسیب سطح سلولی بسیار کمی در محلول‌هایی با غلظت سرب بالا مشاهده شد که با نتایج کادوکووا و همکارانش (Kadukova *et al.*, 2005) و در جذب غیر فعال مس توسط زیست‌توده خشک شده جلبک *C. kessleri* سازگاری دارد.

همچنین تشخیص عناصر فلزی در زیست‌توده باکتری با استفاده از طیف سنج پراکندگی انرژی پرتو ایکس (EDX) صورت گرفت. طبق نتایج بدست آمده از تجزیه و تحلیل میکروگراف EDX سیگنال سرب

1 In-vivo

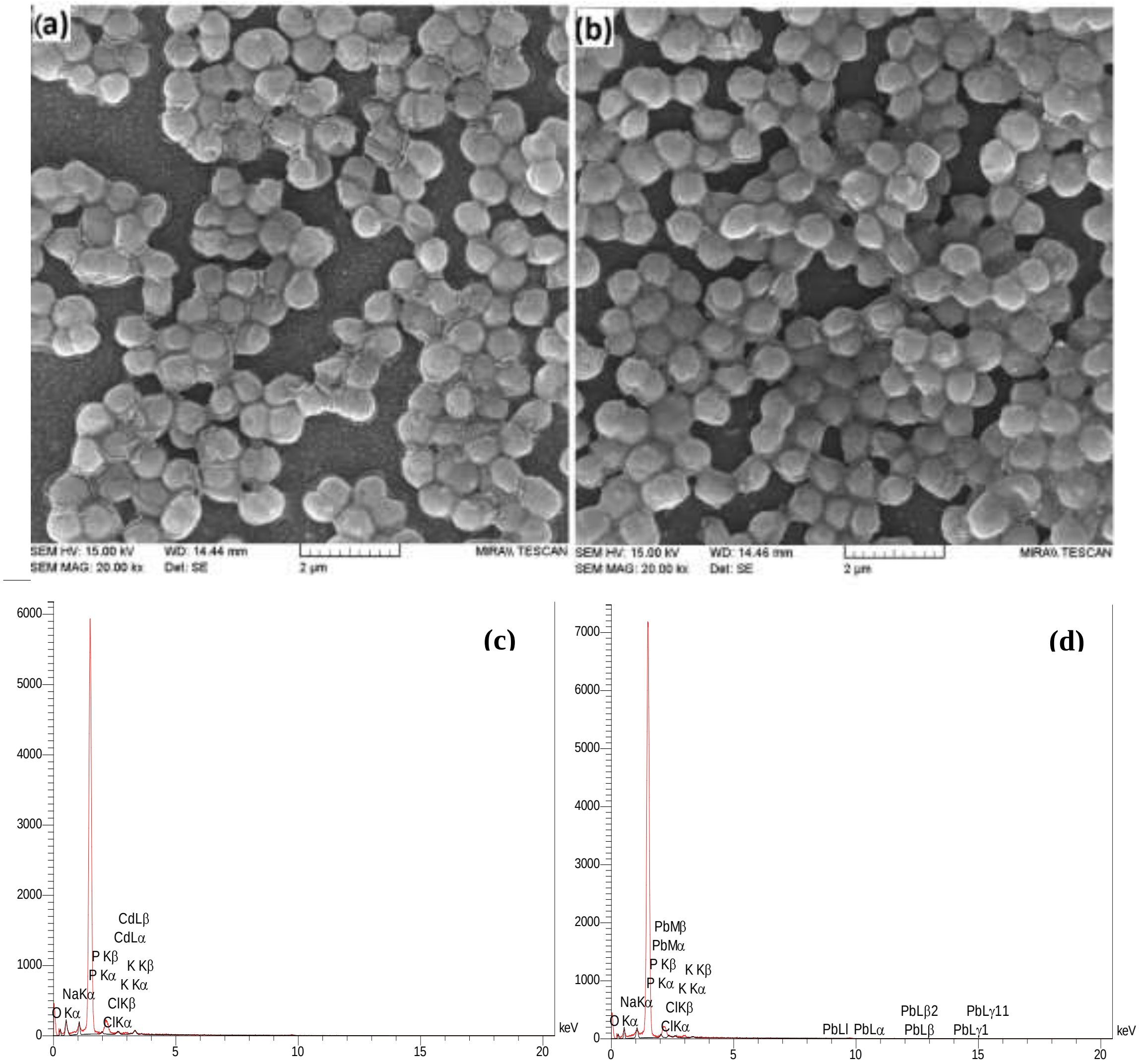
2 decline

در سلول‌های تیمار نشده (کنترل) هم در حالت جذب فعال و هم جذب غیر فعال قابل تشخیص نبود (شکل ۱-c و ۲-c)، اما یک پیک واضح برای سرب در سلول‌های تیمار شده با سرب مشاهده شد (شکل ۱-d و ۲-d)، که نشان‌دهنده وجود سرب به‌دلیل جذب بیولوژیکی است. به عبارت دیگر، طیف EDX پیک سرب اضافی سلول‌های تیمار شده با سرب را تایید کرد که در نمونه شاهد وجود نداشت.



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی باکتری *Ent. Faecium* زنده قبل و بعد از جذب فعال سرب (a) زیست‌توده تیمار نشده (b) زیست توده پس از اتصال سرب (c) طیف پرتو ایکس پراکنده انرژی (EDX) از زیست‌توده تیمار نشده و (d) طیف EDX زیست‌توده پس از اتصال سرب

Fig. 1. Scanning electron microscopy images of live *Ent. faecium* before and after Pb binding. (a) Untreated biomass, (b) Biomass after Pb binding, (c) Energy dispersive X-ray (EDX) spectra of untreated biomass and (d) EDX spectra of biomass after Pb binding



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی باکتری *Ent. Faecium* غیرفعال قبل و بعد از جذب غیر فعال سرب (a) زیست‌توده تیمار نشده (b) زیست‌توده پس از اتصال سرب (c) طیف پرتو ایکس پراکنده انرژی (EDX) از زیست‌توده تیمار نشده و (d) طیف EDX زیست‌توده پس از اتصال سرب

Fig. 2. Scanning electron microscopy images of inactivated *Ent. faecium* before and after Pb binding. (a) Untreated biomass, (b) Biomass after Pb binding, (c) Energy dispersive X-ray (EDX) spectra of untreated biomass and (d) EDX spectra of biomass after Pb binding

تغییرات مورفولوژیکی سطح زیست‌توده *Ent. Faecium* مشاهده شده توسط SEM پس از قرار گرفتن در معرض سرب با مطالعات انجام شده توسط هالتتونن و همکاران (Halttunen *et al*., 2008)، آمین و همکاران (Ameen *et al*., 2020) و ژای و همکاران *Zhai et al*., (2016)، که به‌ترتیب رسوبات عمده سرب را بر روی سطح *Bifidobacterium* و *Lactobacillus fermentum ME3* *longum 46*، رسوبات نیکل و کروم را بر روی سطح *L. plantarum* *MF042018* و رسوبات Cd را بر روی سطح *L. plantarum* *CCFM8610* پس از اتصال یافتند، مطابقت داشت.

اثر باکتری‌های مورد مطالعه بر جذب فلزات سنگین در سبزیجات

با توجه به اینکه بیشترین درصد جذب زیستی عناصر سنگین در سه باکتری *Ent. Faecium*، *L. plantarum* و *L. fermentum* مشاهده شد، بنابراین اثر ترکیبی این سه باکتری به نسبت ۱:۱:۱ بر جذب فلزات سنگین سرب، کادمیوم و نیکل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده اثر هم‌افزایی این سه نوع باکتری بر جذب فلزات سنگین بود، به‌طوری‌که درصد جذب فعال سرب، کادمیوم و نیکل در محلول آبی به‌ترتیب ۹۹/۹۴±۰/۰۲، ۹۹/۹۱±۰/۰۱ و ۹۳/۷۵±۰/۰۴

درصد بود که به‌طور قابل توجهی بالاتر از جذب تکی این باکتری‌ها بود (جدول ۱). بنابراین، با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این مرحله، از ترکیب این سه باکتری اسید لاکتیک در مرحله *in vitro* برای جذب فعال و غیر فعال فلزات سنگین از سبزیجات برگدار خوراکی استفاده شد. سبزیجات بخش عمده‌ای از رژیم غذایی انسان در تقریبا هر نقطه از جهان هستند و مواد مغذی مورد نیاز، فیبرها، آنتی‌اکسیدان‌ها، ویتامین ها و مواد معدنی را تأمین می‌کنند. بسته به ماهیت سبزیجات، برخی از آن‌ها پتانسیل بالایی برای تجمع غلظت بالاتر فلزات سنگین دارند (Yang *et al*., 2009). در این تحقیق بعد از گرفتن نتیجه مطلوب در مرحله آزمایشگاهی در جذب فلزات سنگین از محلول‌های آبی بصورت فعال و غیر فعال، جهت تأیید کردن کارایی بالای این سویه‌ها در حذف این فلزات از مواد غذایی، سه نوع سبزی برگی خوراکی شامل گشنیز، تره‌فرنگی و جعفری انتخاب و پس از اندازه‌گیری مقدار اولیه فلزات سنگین در آن‌ها، اثر ترکیبی این سویه‌ها به‌مدت ۱۵ و ۳۰ دقیقه بر میزان کاهش فلزات سنگین مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳ و ۴). مقدار اولیه سرب در سبزیجات گشنیز، تره فرنگی و جعفری به‌ترتیب برابر ۱/۳۱۴، ۲/۱۴۸ و ۱/۸۵۶ پی‌پی‌ام اندازه‌گیری شد و با تیمار این سبزیجات به مدت ۱۵ دقیقه توسط محلول باکتری‌های زنده LAB این مقادیر به‌ترتیب تا ۰/۰۰۳۸، ۰/۰۰۲۸ و ۰/۰۰۸۶ پی‌پی‌ام کاهش پیدا کرد که معادل ۹۹/۷۱، ۹۹/۸۳ و ۹۹/۵۰ درصد کاهش در میزان این فلزات سنگین می‌باشد. با افزایش مدت زمان تماس بین محلول شستشوی حاوی باکتری و سبزیجات به ۳۰ دقیقه میزان حذف سرب اگرچه روند افزایش داشت ولی چندان قابل توجه نبود و علت آن این است که جذب اصلی سرب در همان ۱۵-۱۰ دقیقه اول و با سرعت بالایی صورت گرفت (جدول ۳). با مقایسه روش جذب فعال و غیر فعال در فلز سرب مشاهده می‌شود که در ۱۵ دقیقه اول، سرعت جذب در روش غیر فعال کمتر از فعال بود بطوری‌که برای سبزیجات گشنیز، تره فرنگی و جعفری میزان جذب سرب به‌ترتیب ۹۲/۹۳، ۹۶/۹۴ و ۸۸/۷۹ درصد اندازه‌گیری شد و با افزایش مدت زمان تماس تا ۳۰ دقیقه مقدار جذب به ۹۴/۰۴ الی ۹۸/۴۸ درصد رسید که نسبت به ۱۵ دقیقه اول، افزایش معنی‌داری بود. نتایج جذب فعال فلز کادمیوم توسط زیست‌توده زنده باکتری‌ها نیز حاکی از جذب بالای ۹۹/۹۰ درصدی در طول ۱۵ دقیقه اول تماس در هر سه نوع سبزی مورد بررسی در این مطالعه بود بنابراین مشابه نتایج جذب سرب، در این مورد نیز افزایش زمان تماس تا ۳۰ دقیقه تأثیر چشمگیری بر تغییرات جذب نداشت چرا که کادمیوم با سرعت بسیار بالا و در مدت زمان کوتاهی جذب زیست توده شد. ارزیابی اثر توده غیرزنده بر جذب کادمیوم نیز روند مشابهی نشان داد بطوری‌که در مدت زمان کمتر از ۱۵ دقیقه بیش از ۹۷ درصد کادمیوم جذب توده غیر فعال گردید و با افزایش زمان تماس تا ۳۰ دقیقه تنها حدود ۲ درصد دیگر بر میزان جذب افزوده شد (جدول ۴). حد مجاز سرب و کادمیوم در سبزیجات برگدار خوراکی طبق استاندارد سازمان جهانی FAO و WHO به‌ترتیب برابر ۰/۳ و ۰/۲ پی‌پی‌ام (Codex, 2001) و طبق استاندارد ایران ۰/۲ و ۰/۱ پی‌پی‌ام می‌باشد (استاندارد ملی، ۱۳۹۰) که طبق نتایج بدست آمده از این مطالعه زیست‌توده باکتری هم بصورت زنده و هم کشته شده قادر بود در مدت زمان ۱۵ دقیقه غلظت سرب و کادمیوم در سبزیجات را به کمتر از حد مجاز برساند (جدول ۳ و ۴). در تحقیقاتی مشابه دیزلی و همکاران (Daisley *et al*., 2019) بیان کردند که کشتن باکتری توسط گرما، تفاوت معنی‌داری در اتصال سرب و کادمیوم، نسبت به باکتری زنده نشان نداد.

طبق استاندارد FAO و WHO میزان مجاز فلز نیکل در سبزیجات برگدار خوراکی ۶۷ پی‌پی‌ام اعلام شده است در حالی‌که میزان نیکل اندازه‌گیری شده در سبزیجات خوراکی مورد بررسی در این مطالعه شامل گشنیز، تره‌فرنگی و جعفری به‌ترتیب ۳۶/۱۱، ۳۳/۱۸ و ۳۱/۸۸ پی‌پی‌ام بود که کمتر از حد مجاز و قابل قبول بود بنابراین برخلاف سرب و کادمیوم که مقدار اولیه آن‌ها خارج از دامنه استاندارد بود و توسط حذف بیولوژیکی در محدوده مجاز قرار گرفت، در مورد نیکل مقدار اولیه این فلز قبل از جداسازی بیولوژیکی در حد مجاز و استاندارد بود و با استفاده از حذف بیولوژیکی ۹۱-۸۵ درصد آن در مدت زمان ۳۰ دقیقه کاهش پیدا کرد. طبق نتایج بدست آمده اثر مدت زمان تماس در مورد نیکل مؤثرتر از دو فلز سرب و کادمیوم بود بدین معنی که در روش جذب فعال بعد از ۱۵ دقیقه ۷۸-۶۸ درصد فلز نیکل از سبزیجات حذف گردید و با افزایش مدت زمان تماس تا ۳۰ دقیقه میزان حذف به ۹۱-۸۵ درصد افزایش پیدا کرد. در روش جذب غیر فعال نیز در ۱۵ دقیقه اول میزان جذب ۵۷-۳۵ درصد و در ۱۵ دقیقه دوم به ۶۹-۶۱ درصد افزایش یافت. نکته قابل توجه این است که در هر دو روش فعال و غیر فعال بیشترین درصد حذف نیکل مربوط به سبزی گشنیز در طول ۳۰ دقیقه تماس بود که یکی از دلایل آن بالاتر بودن غلظت اولیه عنصر نیکل در گشنیز نسبت به دو سبزی دیگر بود. برخی از محققان دریافته‌اند که گروه‌های کربوکسیل، آمین و فسفریل مولکول‌های سطح باکتری در فرآیند اتصال مهم هستند و منجر به جذب سریع و کافی در زمان تماس کوتاه می‌شوند (Bhakta *et al*., 2022).

اگرچه سطح فلزات سنگین در میوه‌ها و سبزیجات نسبتاً پایین است، ولی نمی‌توان اثر تجمعی ناشی از مصرف زیاد آنها را نادیده گرفت. بسیاری از مطالعات بر روی خطر سلامتی ناشی از آلودگی فلزات سنگین در خاک متمرکز شده‌اند. برخی از محققین نشان دادند که در مناطق آلوده ژاپن و چین قرار گرفتن مادام‌العمر در معرض Cd در سطح پایین می‌تواند باعث اختلال عملکرد کلیه و دستگاه گوارش برای ساکنان

محلی شود (Filannino *et al.*, 2015). ژای و همکاران (Zhai *et al.*, 2016) سویه *L. plantarum CCFM8610* را بعنوان یک پروبیوتیک با خواص اتصال نسبتاً خوب به Cd مورد بررسی قرار دادند و کاربرد بالقوه آن را در آب میوه و سبزیجات برای محافظت از انسان در برابر قرار گرفتن در معرض Cd ارزیابی کردند. در مطالعه آنها، سلول های باکتریایی زنده *L. plantarum* به آب میوه و سبزیجات شامل سیب، خیار و گوجه فرنگی برداشت شده از منطقه آلوده در چین با غلظت نهایی ۱۰^۷ cfu/mL اضافه شد و کلنی‌ها پس از ۳۶ ساعت گرمخانه‌گذاری شمارش شدند. پس از آن، مایع رویی برای اندازه‌گیری محتوای کادمیوم توسط اسپکتروفتومتری جذب اتمی شعله جمع‌آوری شد و نتایج نشان داد که میزان حذف کادمیوم در آب میوه‌های مختلف پس از تیمار ۳۶ ساعته با *L. plantarum* از ۵۶/۱۸ تا ۸۱/۷۹ درصد متغیر است. تحقیقات بیشتر نشان داد که ۴۰/۵۴ درصد کادمیوم در بیرون دیواره سلولی تجمع می‌یابد و ۵۴/۳۰ درصد کادمیوم بین غشای سیتوپلاسمی سلولی و دیواره سلولی قرار دارد. میزان کادمیوم وارد شده به پروتوپلاست نیز تقریباً ۷ درصد است. علاوه بر این، این تحقیق همچنین نشان داد که وقتی برخی از گروه‌های عاملی واقع در سطح سلولی باکتری اصلاح شوند، توانایی اتصال Cd آن مختل می‌شود. به عنوان مثال، متیلاسیون گروه‌های آمینه در سطح سلول به کاهش توانایی اتصال Cd از ۴۸/۱۶٪ به ۵/۹۵٪ منجر شد، این نوع کاهش همچنین هنگامی‌که گروه های کربوکسیل خنثی شدند نیز مشاهده شد و این موضوع نشان‌دهنده اهمیت گروه های عاملی موجود در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت در پاک‌سازی زیستی فلزات سنگین می‌باشد (Yang *et al.*, 2009). مشاهدات میکروسکوپ الکترونی و طیف پرتو ایکس پراکنده انرژی (EDX) تایید کرد که بخش عمده Cd به سطح سلول باکتری متصل شده است.

جذب زیستی فرآیندی وابسته به انرژی است و از این رو دما نقش مهمی در راندمان حذف فلز توسط آن ایفا می‌کند. این راندمان با تغییر دما که بر دیواره سلولی و بخش‌های عملکردی آن تأثیر می‌گذارد افزایش یا کاهش می‌یابد و با تغییر پایداری و ترکیب دیواره سلولی و وضعیت یونیزاسیون گروه‌های عاملی تأثیر می‌گذارد (Bhakta *et al.*, 2022). بسیاری از محققان بیان کرده‌اند که جذب زیستی و تجمع زیستی فلزات سنگین توسط LAB هر دو استراتژی های سم‌زدایی موفقی هستند زیرا از قرار گرفتن فلزات سنگین در سلول‌ها و بافت‌های بدن جلوگیری می‌کنند (Karami *et al.*, 2020; Fakhri *et al.*, 2020).

جدول ۳- مقادیر فلزات سنگین در سبزیجات برگدار خوراکی قبل و بعد از قرار گرفتن در معرض ترکیبی از سویه‌های فعال LAB منتخب (*L. plantarum*، *L. fermentum* و *E. faecium*) بعنوان محلول شستشو

Table 3. Amounts of heavy metals in edible leafy vegetables before and after exposure to selected LAB isolates (*L. plantarum*, *L. fermentum* and *E. faecium*) when used in combination for washing solution (mgkg^{-1})

Sample	Pb			Cd			Ni		
	Time (min) مدت زمان تماس								
	Control	15	30	Control	15	30	Control	15	30
Coriander گشنیز	1.314 ±0.005	0.0038 ^{b,C} ±0.0003	0.0012 ^{a,AB} ±0.0001	1.118 ±0.001	0.0008 ^{a,B} ±0.0001	0.0003 ^{a,A} ±0.0001	36.111 ±0.009	7.631 ^{a,E} ±0.004	3.182 ^{a,D} ±0.003
Leek تره فرنگی	2.148 ±0.009	0.0028 ^{a,C} ±0.0002	0.0011 ^{a,B} ±0.0001	1.053 ±0.002	0.0009 ^{a,B} ±0.0000	0.0003 ^{a,A} ±0.0001	33.183 ±0.008	10.414 ^{c,E} ±0.002	4.803 ^{c,D} ±0.003
Parsley جعفری	1.856 ±0.012	0.0086 ^{c,D} ±0.0001	0.0039 ^{b,C} ±0.0004	1.021 ±0.002	0.0006 ^{a,B} ±0.0001	0.0032 ^{a,A} ±0.0002	31.879 ±0.005	9.111 ^{b,F} ±0.005	4.002 ^{b,E} ±0.004

* حروف کوچک غیر مشترک در هر ستون و حروف بزرگ غیر مشترک در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۹۵ درصد می‌باشد (*p*<۰/۰۵). همچنین اعداد انحراف معیار کمتر از ۰/۰۰۱ ذکر نشده است.

* Different small letters in each column and uppercase letters in each row indicate statistically significant differences between groups as determined by the Duncan test (*p*<0.05)

جدول ٤- مقادیر فلزات سنگین در سبزیجات برگدار خوراکی قبل و بعد از قرار گرفتن در معرض ترکیبی از توده غیرفعال سویه‌های LAB منتخب (*L. plantarum*، *L. fermentum* و*E. faecium*) بعنوان محلول شستشو (mgkg-1)

Table 4- Amounts of heavy metals in edible leafy vegetables before and after exposure to selected inactivated LAB isolates (*L. plantarum, L. fermentum* and *E. faecium*) when used in combination for washing solution (mgkg-1)

Sample	Pb			Cd			Ni		
	Time (min) مدت زمان تماس								
	Control	15	30	Control	15	30	Control	15	30
Coriander گشنیز	1.314c,A ±0.005	0.0928b,B ±0.0002	0.0448a,C ±0.0001	1.118a,A ±0.008	0.0286b,B ±0.0003	0.0191a,C ±0.0001	36.111a,A ±0.009	15.483c,B ±0.002	10.846c,C ±0.003
Leek تره فرنگی	2.148a,A ±0.009	0.0656a,B ±0.0003	0.0324b,C ±0.0001	1.053b,A ±0.006	0.0342a,B ±0.0001	0.0171b,C ±0.0001	33.183b,A ±0.008	19.407b,B ±0.004	11.506b,C ±0.001
Parsley جعفری	1.856b,A ±0.012	0.0209c,B ±0.0004	0.0192c,C ±0.0001	1.021c,A ±0.005	0.0231c,B ±0.0002	0.0132c,C ±0.0000	31.879c,A ±0.005	20.418a,B ±0.002	12.118a,C ±0.001

* حروف کوچک غیر مشترک در هر ستون و حروف بزرگ غیر مشترک در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۹۵ درصد می‌باشد (p<۰/۰۵).
همچنین اعداد انحراف معیار کمتر از ۰/۰۰۱ ذکر نشده است.

* Different small letters in each column and uppercase letters in each row indicate statistically significant differences between groups as determined by the Duncan test (p<0.05).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که سویه‌های مورد استفاده در این مطالعه توانایی بسیار خوبی در جذب فلزات سرب، کادمیوم و نیکل از محلول آبی داشتند. به‌طور کلی، فرآیند جداسازی فلزات سنگین از محلول توسط سلول‌های زنده بسیار سریع بود و با بکار بردن زیست توده غیر فعال سرعت جذب این فلزات سمی افزایش قابل توجهی نشان داد بطوری‌که در مدت زمان کمتر از یک ساعت حدود ۹۸ درصد سرب، ۸۶ درصد نیکل و ۸۱ درصد کادمیوم از محلول‌های آزمایشگاهی جذب این باکتری‌های غیر زنده گردید. طبق نتایج مرحله برون تنی که از ترکیب سه سویه منتخب با بالاترین درصد جذب شامل *L. plantarum*، *L. fermentum* و*E. faecium* استفاده شد، راندمان حذف فلزات سنگین توسط سلول‌های زنده در مدت زمان ۳۰ دقیقه تا حدودی بالاتر از ارگانیسم‌های کشته شده بود ولی در هر دو حالت در مدت زمان بسیار کوتاهی سطح فلزات سنگین موجود در سبزیجات برگدار خوراکی به کمتر از حد مجاز و استاندارد جهانی و داخلی رسید. نتایج تصاویر SEM و EDX حاکی از تجمع فلز سرب بر روی سطح باکتری *E. faecium* زنده و آسیب بیشتر به دیواره سلولی بود در حالی که در مورد زیست‌توده غیر زنده تغییرات سطح دیواره بسیار ناچیز بود. بطور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که زیست‌توده زنده و همچنین غیر زنده سویه‌های LAB دارای کارایی بسیار بالایی در حذف فلزات سنگین از محیط‌های آبی و مواد غذایی می‌باشد ولی استفاده از زیست توده غیر زنده مزایایی دارد که بطور خلاصه اشاره می‌گردد؛ وقتی از سلول‌های زنده استفاده می‌شود، همیشه این خطر وجود دارد که فلز بتواند در داخل سلول جمع شده و زباله‌های جدیدی ایجاد شود. همچنین، پیش‌بینی رفتار سلول زنده در حضور یک فلز سنگین دشوارتر است، در صورتی‌که زیست‌توده برای تهیه جاذب در زمان کشت یکسان جداسازی نشود، ظرفیت جذب سلول‌ها می‌تواند متفاوت باشد. همچنین آسیب جدی سلول‌های زنده باعث کاهش ظرفیت فرآیند و عدم امکان استفاده مجدد از زیست‌توده می‌شود. مزیت بزرگ دیگر استفاده از زیست‌توده مرده امکان تثبیت آن در ساختارهای جامد است که باعث می‌شود ماده‌ای با اندازه مناسب، استحکام مکانیکی، سختی و تخلخل مناسب برای استفاده در ستون‌های جذب ضروری باشد. به این دلایل، زیست‌توده مرده به جاذب زیستی مناسب‌تری برای فلزات سنگین تبدیل شده است.

References

1. Afraz, V., Younesi, H., Bolandi, M., & Hadiani, M.R. (2021). Assessment of resistance and biosorption ability of Lactobacillus paracasei to remove lead and cadmium from aqueous solution. *Water Environment Research, 93*(9), 1589-1599. https://doi.org/10.1002/wer.1540
2. Ameen, F.A., Hamdan, A.M., & El-Naggar, M.Y. (2020). Assessment of the heavy metal bioremediation efficiency of the novel marine lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* MF042018. *Scientific Reports, 10*(1), 1-11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-57210-3
3. Arivalagan, P., Singaraj, D., Haridass, V., & Kaliannan, T. (2014). Removal of cadmium from aqueous solution by batch studies using *Bacillus cereus*. *Ecological Engineering, 71*, 728-735. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.08.005

4. Astolfi, M. L., Protano, C., Schiavi, E., Marconi, E., Capobianco, D., Massimi, L., & Mastromarino, P. (2019). A prophylactic multi-strain probiotic treatment to reduce the absorption of toxic elements: In-vitro study and biomonitoring of breast milk and infant stools. *Environment International, 130*, 104818. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.012
5. Bhakta, J. N., Ohnishi, K., Tsunemitsu, Y., Ueno, D., & Manna, K. (2022). Assessment of arsenic sorption properties of lactic acid bacteria isolated from fecal samples for application as bioremediation tool. *Applied Water Science, 12*, 116. https://doi.org/10.1007/s13201-022-01634-2
6. Codex Alimntarius commission (WHO/FAO). (2001). Food additives and contaminants joint, (WHO/FAO). Food standard program. ALINORM 01/12A, Geneva: Jo, 1-289.
7. Daisley, B.A., Monachese, M., Trinder, M., Bisanz, J.E., Chmiel, J.A., Burton, J.P., & Reid, G. (2019). Immobilization of cadmium and lead by Lactobacillus rhamnosus GR-1 mitigates apical-to-basolateral heavy metal translocation in a Caco-2 model of the intestinal epithelium. *Gut Microbes, 10*(3), 321-333. https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1526581
8. Delgado, A., Anselmo, A.M., & Novais, J.M. (1998). Heavy metal biosorption by dried powdered mycelium of Fusarium flocciferum. *Water Environment Research, 70*(3); 370-376. https://doi.org/10.2175/106143098X125019
9. Elahian, F., Moghimi, B., Dinmohammadi, F., Ghamghami, M., Hamidi, M., & Mirzaei, S.A. (2013). The anticancer agent prodigiosin is not a multidrug resistance protein substrate. *DNA and Cell Biology, 32*(3), 90-97. https://doi.org/10.1089/dna.2012.1902
10. Elsanhoty, R.M., Al-Turki, I.A., & Ramadan, M.F. (2016). Application of lactic acid bacteria in removing heavy metals and aflatoxin B1 from contaminated water. *Water Science and Technology, 74*(3), 625-638. https://doi.org/10.2166/wst.2016.255
11. Fakhri, Y., Djahed, B., Toolabi, A., Raoofi, A., Gholizadeh, A., Eslami, H., Taghavi, M., Alipour, M.R., & Mousavi Khaneghah, A. (2020). Potentially toxic elements (PTEs) in fillet tissue of common carp (*Cyprinus carpio*): a systematic review, meta-analysis and risk assessment study. *Toxin Reviews, 40*(4), 1505-1517. https://doi.org/10.1080/15569543.2020.1737826
12. Filannino, P., Bai, Y., Di Cagno, R., Gobbetti, M., & Gänzle, M.G. (2015). Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiology, 46*, 272-279. https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.018
13. Foligné, B., Daniel, C., & Pot, B. (2013). Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology, 16*(3), 284-292. https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.008
14. Goyal, P., Belapurkar, P., & Kar, A. (2019). A review on in vitro and in vivo bioremediation potential of environmental and probiotic species of *Bacillus* and other probiotic microorganisms for two heavy metals, Cadmium and Nickel. *Biosciences Biotechnology Research Asia, 16*(1), 1-13. https://doi.org/10.13005/bbra/2714
15. Halttunen, T., Salminen, S., & Tahvonen, R. (2007). Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *114*(1), 30- 35. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.040
16. Halttunen, T., Salminen, S., Meriluoto, J., Tahvonen, R., & Lertola, K. (2008). Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology, 125*, 170-175. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.041
17. Hossain, A., & Aditya, G. (2013). Cadmium biosorption potential of shell dust of the fresh water invasive snail *Physaacuta*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *1*(3), 574-580. https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.06.030
18. ISIRI (Institute of Standards and Industrial Research of Iran), 2011. Food & feed-maximum limit of heavy metals. Iranian National Standard 12968 (1st revision).
19. Jain, A.N., Udayashankara, T.H., Lokesh, K.S., & Sudarshan, B.L. (2017). Bioremediation of lead, nickel and copper by metal resistant *Bacillus licheniformis*isolated from mining site: optimization of operating parameters under laboratory conditions. *International Journal of Engineering Research & Technology, 5*, 13-32.
20. Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., & Beeregowda, K.N. (2014). Toxicity mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol*, *7*, 60-72. https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009
21. Kaduková, J., & Virčíková, E. (2005). Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. *Environment International, 31*, 227- 232. https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.09.020
22. Karami, H., Shariatifar, N., Nazmara, S., Moazzen, M., Mahmoodi, B., & Mousavi Khaneghah, A. (2020). The concentration and probabilistic health risk of potentially toxic elements (PTEs) in edible mushrooms (wild and cultivated) samples collected from different cities of Iran. *Biological Trace Element Research, 199*, 389-400. https://doi.org/10.1007/s12011-020-02130-x

23. Kinoshita, H., Sohma, Y., Ohtake, F., Ishida, M., Kawai, Y., Kitazawa, H., & Kimura, K. (2013). Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Research in Microbiology, 164*(7), 701-709. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.04.004
24. Kirillova, A.V., Danilushkina, A.A., Irisov, D.S., Bruslik, N.L., Fakhrullin, R.F., Zakharov, Y.A., Bukhmin, V.S., & Yarullina, D.R. (2017). Assessment of resistance and bioremediation ability of *Lactobacillus* strains to Lead and Cadmium. *International Journal of Microbiology, 2017*. https://doi.org/10.1155/2017/9869145
25. Majlesi, M., Shekarforoush, S.S., Ghaisari, H.R., Nazifi, S., & Sajedianfard, J. (2017). Effect of *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus plantarum* as probiotic on decreased absorption of cadmium in rat. *Journal of Food Hygiene, 6*(22), 25-33.
26. Massoud, R., Khosravi-Darani, K., Sharifan, A., Asadi, G., & Zoghi, A. (2020). Lead and cadmium biosorption from milk by *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Food Science & Nutrition, 8*, 5284-5291. https://doi.org/10.1002/fsn3.1825
27. Mirza Alizadeh, A., Hosseini, H., Mohseni, M., Eskandari, S., Sohrabvandi, S., Hosseini, M.J., Tajabadi-Ebrahimi, M., Mohammadi-Kamrood, M., & Nahavandi, S. (2021). Analytic and chemometric assessments of the native probiotic bacteria and inulin effects on bioremediation of lead salts. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 101*(12), 5142-5153. https://doi.org/10.1002/jsfa.11160
28. Mrvčić, J., Stanzer, D., Šolić, E. & Stehlik-Tomas, V. (2012). Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28*, 2771-2782. https://doi.org/10.1007/s11274-012-1094-2
29. Özdemir, S., Kýlýnc¸ E., Poli, A., & Nicolaus, B. (2013). Biosorption of heavy metals (Cd_2^+, Cu_2^+, Co_2^+, and Mn_2^+) by thermophilic bacteria, *Geobacillus thermantarcticus* and *Anoxybacillus amylolyticus*: equilibrium and kinetic studies. *Bioremediation Journal, 17*(2), 86-96. https://doi.org/10.1080/10889868.2012.751961
30. Pakdel, M., Soleimanian-Zad, S., & Akbari-Alavijeh, S. (2019). Screening of Lactic acid bacteria to detect potent biosorbents of lead and cadmium. *Food Control, 100*, 144-150. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.044
31. Priyalaxmi, R., Murugan, A., Raja, P., & Raj, K.D. (2014). Bioremediation of cadmium by *Bacillus safensis* (JX126862), a marine bacterium isolated from mangrove sediments. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3*(12), 326-335.
32. Rathinam, A., Maharshi, B., Janardhanan, S.K., Jonnalagadda, R.R., & Nair, B.U. (2010). Biosorption of cadmium metal ion from simulated wastewaters using *Hypneavalentiae* biomass: a kinetic and thermodynamic study. *Bioresource Technology, 101*(5), 1466–1470. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.008
33. Sardar, K., Ali, S., Hameed, S., Afzal, S., Fatima, S., Shakoor, M.B., & Tauqeer, H.M. (2013). Heavy metals contamination and what are the impacts on living organisms. *Greener Journal of Environmental Management and Public Safety, 2*(4), 172-179.
34. Shamim, S. (2018). Biosorption of heavy metals. *Biosorption, 2*, 21-49. https://doi.org/10.5772/intechopen.72099
35. Sulaymon, A.H., Mohammed, A.A., & Al-Musawi, T.J. (2013). Competitive biosorptionoflead, cadmium, copper, and arsenic ions using algae. *Environmental Science and Pollution Research, 20*, 3011-3023. https://doi.org/10.1007/s11356-012-1208-2
36. Xiao, X., Luo, S., Zeng, G., Wei, W., Wan, Y., Chen, L., Guo, H., Cao, Z., Yang, L., Chen, J., & Xi, Q. (2010). Biosorption of cadmium by endophytic fungus (EF) *Microsphaeropsis* sp. LSE10 isolated from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresource Technology, 101*(6), 1668-1674. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.083
37. Yang, Y., Zhang, F.S., Li, H.F., & Jiang, R.F. (2009). Accumulation of cadmium in the edible parts of six vegetable species grown in Cd-contaminated soils. *Journal of Environmental Management, 90*(2), 1117-1122. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.05.004
38. Zahedifar, M., Moosavi, A.A., Zarei, Z., Shafigh, M., & Karimian, F. (2019). Heavy metals content and distribution in basil (*Ocimum basilicum* L.) as influenced by cadmium and different potassium sources. *International Journal of Phytoremediation, 21*(5), 435-447. https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1537253
39. Zhai, Q., Tian, F., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Cross, K., & Chen, W. (2016). The cadmium binding characteristics of a lactic acid bacterium in aqueous solutions and its application for removal of cadmium from fruit and vegetable juices. *RSC Advances, 6*(8), 5990-5998. https://doi.org/10.1039/C5RA24843D
40. Zhai, Q., Xiao, Y., Tian, F., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., & Chen, W. (2015). Protective effects of lactic acid bacteria-fermented soymilk against chronic cadmium toxicity in mice. *RSC Advances, 5*(6), 4648-4658. https://doi.org/10.1039/C4RA12865F
41. Zoghi, A., Khosravi-Darani, K., & Sohrabvandi, S. (2014). Surface binding of toxins and heavy metals by probiotics. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 14*(1), 84-98.